

脱氮硫杆菌硫转移酶 SoxAX 的建模及分子对接

孟志忠, 陆远芳, 陈新, 罗义, 李杉

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 硫氧化酶系统 (Sulfur oxidizing, Sox) 在脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*, *Td*) 的硫代谢过程中起着至关重要的作用, 其核心为 SoxAXYZB, 硫化物需先经 SoxAX 蛋白催化并转移到 SoxYZ 上才能进行 Sox 通路后续的硫氧化反应, 而目前尚无脱氮硫杆菌 SoxAX 蛋白结构解析的报道。本文采用反向折叠法构建了 SoxAX 蛋白的二聚体结构并验证其合理性, 并通过分子对接实验探讨 SoxAX 蛋白模型与硫代硫酸盐、硫化氢和亚硫酸盐等不同底物结合在构型与能量上的差异。结果表明, 构建的 SoxAX 二聚体蛋白结构相对合理, 氢键是维持 SoxAX 二聚体结合的主要作用力, 10 个短强氢键和 1 个 π 键作用力参与维持二聚体结构的稳定, SoxAX 的 Arg160 等 6 个残基及 SoxX 的 Asn15 等 8 个残基对维持二聚体结构有重要作用。分子对接试验显示氢键是维持底物与 SoxAX 结合的主要作用力, 与底物结合的关键氨基酸为 Arg210、Cys214 和 Gln217。在三种底物与酶结合的亲和力中以硫化氢最高、硫代硫酸盐次之、亚硫酸盐最低。

关键词: 脱氮硫杆菌; Sox 蛋白; 反向折叠建模; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2017)4-73-81

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.012

Threading Modeling and Molecular Docking for Sulfur Oxidation Protein

SoxAX of *Thiobacillus denitrificans*

MENG Zhi-zhong, LU Yuan-fang, CHEN Xin, LUO Yi, LI Shan

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The sulfur oxidizing (Sox) enzyme complex plays a vital role in the sulfur metabolism of *Thiobacillus denitrificans* (*Td*), with the SoxAXYZB complex enzyme at its core. Inorganic sulfur compound substrates need to be successfully combined on the SoxAX complex and transferred to the carrier SoxYZ for further subsequent sulfur oxidation. However, the three-dimensional (3D) structure of *Td* SoxAX has not yet been elucidated. The protein threading method was adopted in this study in order to construct the *Td* SoxAX dimer, and the result was verified. Differences in the configuration and energy of binding between the SoxAX protein model and the substrates thiosulfate, hydrogen sulfide, and sulfite were then explored using molecular docking experiments. The result shows that the 3D structure of the constructed SoxAX dimer was relatively reliable. Hydrogen bonds were the major forces that maintained the interaction between SoxA and SoxX. Ten short and strong hydrogen bonds and one pi-pi interaction were involved in stabilizing the dimer structure, and six residues including Arg160 in SoxA and eight residues including Asn15 in SoxX played an important role in the stability of the dimer. Molecular docking studies showed that hydrogen bonds were the major force maintaining the binding between SoxAX and the three different substrates. The key residues for substrate binding were Arg210, Cys214, and Gln217. Among the three substrates, sulfide showed the highest binding energy, followed by thiosulfate and sulfite.

Key words: *Thiobacillus denitrificans*; SoxAX cytochromes; threading modeling; molecular docking

脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*, 简称 *Td*) 是硫杆菌属革兰氏阴性能自养菌, 1904 年由 Beijerinck 首次分离获得, 是一种在生物脱硫、污水处理工艺中应用较广的硫氧化细菌^[1,2]。它可以在有氧条件下氧化

收稿日期: 2016-05-06

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2016A030313457)

作者简介: 孟志忠 (1961-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 领域为生物信息学

通讯作者: 李杉 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学、细胞生物学

硫化物并以胞外硫泡 (sulfur globule) 的形式产生具有经济价值的单质硫, 而在厌氧条件下则以硫代硫酸盐为电子供体, 硝酸盐等氮化合物为电子受体进行化能自养, 起同步脱硫反硝化的作用^[2]。

Sox (sulfur oxidation) 复合酶系是由 *sox* 基因簇编码硫氧化复合酶系, 是硫氧化细菌实现需氧能量代谢及厌氧下的硫代谢偶联反硝化反应的重要一环, 其核心是 SoxAX、SoxYZ、SoxB 和 Sox(CD)₂ 蛋白^[3-5]。在完整的 Sox 途径中, 该反应催化底物硫代硫酸盐氧化为硫酸盐, 并释放 8 个电子和 10 个还原氢, 为氧化

磷酸化反应及硫代谢偶联的脱硝反应供能^[3-6]。此外也有研究表明, Sox 途径也能催化硫化氢、亚硫酸盐等硫化物氧化^[6]。在 Sox(CD)₂ 蛋白缺失的细菌中, 硫化物可在 SoxAX 和 SoxB 的催化下, 在 SoxYZ 末端不断累积形成链状过硫化物, 该物质为生物脱硫过程中产生单质硫的前体物质^[3-6]。脱氮硫杆菌基因组仅包含不完整的 sox 基因簇 (soxAXYZB), Sox(CD)₂ 蛋白的缺乏使脱氮硫杆菌能以硫泡的形式产出易于回收的单质硫^[1,2], 因此研究该菌种的硫代谢机制在基础研究和工艺应用上均具有十分重要的意义。

SoxAX 蛋白是硫化物进入 Sox 反应途径的第一步, 硫代硫酸盐等底物必须与 SoxA 血红素反应中心附近的半胱氨酸残基反应, 才能将硫化物转移到转运蛋白 SoxYZ 上继而完成 Sox 通路^[3,6]。SoxAX 在结构上表现为 diheme 和 triheme 两种, 血红素结合区为高度保守的“CXXCH”结构, 通过半胱氨酸的巯基与血红素的 Ca 骨架上的实现共价连接, 血红素与 His/Cys 形成轴向平面, 在多种 SoxAX 催化机制假说中均显示该位点与电子传递及转运蛋白 SoxYZ 结合有关^[6-9]。目前 SoxAX 家族已获得结晶结构的有 *Rhodovulum Sulfidophilum*^[7], *Paracoccus pantotrophus*^[8], 以及 *Starkeya novella*^[9], 但目前为止, 尚无脱氮硫杆菌 SoxAX 蛋白的结构解析成功, 在其他菌种中也缺乏 SoxAX 与底物结合结构的相关报道, 这对于解释 SoxAX 的催化机制以及菌种改造应用十分不利。

与脱硫工艺应用研究的相比, 脱氮硫杆菌在脱硫机制的基础研究上相对薄弱, 结构学研究更是长期滞后, 这对脱氮硫杆菌硫代谢酶系的改造十分不利。本研究利用反向折叠建模方法和分子力学模拟, 对脱氮硫杆菌的 SoxAX 蛋白二聚体进行了三维结构构建、优化、评估和分析, 并针对构建的模型与不同底物分别进行对接, 旨在深入了解该蛋白在代谢途径中功能和作用, 为进一步研究脱氮硫杆菌的脱硫机制及后续工程菌改造提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 序列来源

目标氨基酸序列来自脱氮硫杆菌 ATCC25259 菌株基因组^[1], 在 NCBI 数据库的 Accession ID 分别为 SoxA(AAZ92517.1)和 SoxX(AAZ96520.1)。

1.2 相关软件和数据库

本文涉及的生物信息数据库、服务器和软件如下: 基因和蛋白质序列检索数据库 NCBI([\[ncbi.nlm.nih.gov/\]\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/\)\), 蛋白质数据库 UniProt\(<http://www.uniprot.org/>\), 蛋白质结构数据 RCSB PDB\(<http://www.rcsb.org/pdb/home>\), 信号肽预测 SignalP \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>\), 多序列同源比对服务器 Clustal O \(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>\), 蛋白质结构预测服务器 i-TASSER\(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>\), 蛋白质结构分析与评估在线服务器 SAVES\(<https://www.came.sbg.ac.at/prosa.php>\), 蛋白质结构分析服务器 Prosa \(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>\), Discovery Studio\(DS\) 3.5 分子模拟平台, 此软件在 DELL PRECISION T5500 图形工作站上运行。](http://www.</p></div><div data-bbox=)

1.3 实验方法

1.3.1 SoxAX 二聚体全酶结构的构建

通过 SignalP 分别预测 SoxA 和 SoxX 蛋白氨基酸序列的信号肽。去除信号肽后的 SoxA 和 SoxX 氨基酸序列分别通过 BLAST 和 PSI-BLAST 工具在 PDB 数据库寻找合适的模板, 限定条件为 E-value>e-5。将目标序列与模板序列提交到 Clustal Omega 服务器进行多序列比对, 确定保守区域。其后将目标序列和推荐模板分别提交到 i-TASSER 服务器进行反向折叠建模, 获得若干初始构象, 选取评分 C-Score 和能量综合评分最优的构象备用^[10]。

以 1H32 为模板搭建 SoxAX 二聚体模型。将上一节建模所得 SoxA 和 SoxX 蛋白最优初始结构分别与 *Rhodovulum Sulfidophilum* 的 1H32 的 A 链和 B 链拟合, 获得 SoxAX 二聚体初始结构 S₀。将构建的 SoxAX 二聚体初始结构与 SoxAX 家族现有结晶结构进行结构比对, RMSD Cutoff 为 2.5, Length Cutoff 为 50, Binsize 为 20, 分析蛋白质结构的保守区, 获得的活性中心区域信息(包含血红素结合位点), 用于指导血红素结合。以 1H32 为模板, 分别将 1H32 的血红素配体 HEC2 和 HEC3 拟合到上文获得的 SoxAX 可能的血红素结合位点上, 并建立共价键连接配体, 最终得到含血红素的 SoxAX 全酶结构的初始结构 S₁ 备用。

1.3.2 SoxAX 二聚体全酶结构的优化、评估及相互作用分析

全酶结构的优化通过 Discovery Studio (DS) 的 Simulation 模块于 CHARMM 力场下, 对 SoxAX 二聚体初始结构 S₁ 进行分子力学优化。分别以固定碳骨架及血红素和仅固定血红素的方式, 使用最陡下降法 (steepest descent) 和共轭梯度法 (conjugate gradient) 对初始模型以 0.1 kcal/mol 和 0.001 kcal/mol 为收敛依据进行分步能量最小化处理, 直至能量优化后的结构

RMS<0.001 kcal/mol, 最终得到获得稳定的 SoxAX 二聚体结构。结果通过 Discovery Studio 自带的 PROCHECK、Verify (profile-3D) 及 ProSA 在线服务器进行评价。SoxAX 二聚体相互作用分析通过 Discovery Studio(DS) 的 Macromolecules 模块和 Simulation 模块, 分析 SoxA 和 SoxX 亚基间结合界面的氢键作用和静电相互作用。

1.3.3 SoxAX 与硫代硫酸盐 $S_2O_3^{2-}$ 、硫化氢 H_2S 、亚硫酸盐 SO_3^{2-} 的分子对接分析

为研究脱氮硫杆菌在硫代谢中底物硫代硫酸盐 $S_2O_3^{2-}$ 、硫化氢 H_2S 、亚硫酸盐 SO_3^{2-} 与 SoxAX 蛋白之间的相互作用, 通过 DS 的 Binding Site 模块检索孔洞的方法定位所有可能的口袋, 然后结合检索信息和 SoxAX 蛋白家族的保守序列及文献报道的氧化还原中心来预测并定义 *Td* SoxAX 与底物反应的活性中心。以本次构建的 SoxAX 二聚体为受体, 以 PubChem 和 PDB 数据库中的游离硫代硫酸盐 $S_2O_3^{2-}$ 结构 (CID: 1084)、亚硫酸盐 SO_3^{2-} 结构 (PDB: SO_3) 和硫化氢 H_2S 结构 (PDB: H_2S) 为配体, 在 Discovery Studio(DS) 的 CHARMm 力场下运用 CDOCKER 模块于进行分子模拟对接, 各构建 30 个可能的 poses, 并选取其中最佳构象进行结合能及氢键分析。

2 结果与讨论

蛋白质空间结构预测方法主要分为无模板预测法 (如从头预测法) 和模板预测法 (包括同源建模法和反向折叠法等), 其中反向折叠预测法是依据蛋白质的空间结构保守为基础进行蛋白质结构预测, 尤其在当目标序列与模板的序列相似性较低 (小于 30%), 同源建模法的可靠性较低时, 反向折叠法往往能得到较好的预测结果^[13,14]。本文中 SoxA 序列与模板的同源性在 24%~28% 间, SoxX 序列与模板的同源性在 24%~35% 之间。序列一致性偏低, 不适用同源建模, 故选用反向折叠法进行单体建模。

i-TASSER 服务器^[10]是由 University of Michigan 的 Zhang Yang 等学者在 TASSER 软件的基础上改进而成, 它应用反向折叠的思路, 按最低自由能原理预测蛋白质结构, 并通过已知蛋白质片断进行再切割和组合, 大大提高预测精度。自 2006 年起, i-TASSER 服务器在 CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction) 大赛连续多年获得模板预测法及无模板预测法的第一名^[10,13,14]。本课题组曾采用不同的软件和服务器对 SoxA 蛋白和 SoxX 蛋白进行建模, 并采用 PROCHECK、Verify (profile-3D) 及 ProSA 在线服务器对模型的构象和能量评价, 结果表明 i-TASSER 服

务器的建模结果在能量和构象上均优于其它软件和服务器建模的结果, 最终选择 i-TASSER 服务器建模产生的 SoxA.model1 和 SoxX.model1 进行下一步实验。

目前包括突变体在内, SoxAX 家族已通过 X 射线衍射法成功解析出 7 个结晶结构, 分别来自 *Rhodovulum Sulfidophilum*, *Paracoccus pantotrophus* 和 *Starkeya novella*^[7-9]。其中, PDB ID 为 1H32 的 *RS* SoxAX^[7] 为本次二聚体建模采用的模板。它来自 *Rhodovulum Sulfidophilum DSM1374*^T, 解析度达到 1.5 Å, 在已有 SoxAX 蛋白结晶结构中解析程度最高。该蛋白的 SoxA 亚基和 SoxX 亚基分别包含 261 和 138 个氨基酸残基, 与目标蛋白的氨基酸残基数最为接近。因此我们最终选择以 1H32 为模板构建脱氮硫杆菌的二聚体模型。

Sox 硫氧化酶系的 SoxA 蛋白和 SoxX 蛋白均属于细胞色素 c 超家族, 而细胞色素 c 超家族具有 CXXCH 典型的保守结构区, 保守区上的两个半胱氨酸的巯基分别与血红素铁-原卟啉环区结构基础上的两个 $-CH=CH_2$ 反应, 以形成硫醚键的形式与蛋白共价相连^[3,6-9]。其中, SoxX 具有典型的细胞色素 c 结构, 采用细胞色素 c 族中常见的 His/Met-heme 配位方式; 而 SoxA 上则存在两个伪双重对称 (pseudo twofold symmetry) 的类细胞色素 c 结构域, 血红素活性中心为 His/Cys-heme 配位方式而不是该超家族中更常见的 His/Met-heme 配位方式^[3,6-9]。在脱氮硫杆菌中, 靠近 C 端结构域 2 上的 Cys168-His172 区域为血红素 HEC2 的绑定区域, HEC2、His172 与 Cys214 形成 His/Cys-heme 相互作用中心; 而在靠近 N 端的结构域 1 同源蛋白中 HEC1 的位点上, 并没有血红素结合区域, TYR69 取代了在一类 SoxAX 蛋白中该位点的 Cys 残基, 其侧链亦对结合域 1 上的凹槽进行封闭, 使得脱氮硫杆菌 SoxAX 在该位置上既无法象 *Pp* SoxAX 和 *Rs* SoxAX 等一类 SoxAX 蛋白结合血红素^[7,8], 也无法像 *Sn* SoxAX 等二类 SoxAX 蛋白在 Cys72 和 Cys104 间形成二硫键^[9]。

自 1985 年首次完成 SoxAX 分离和表征后, 对 Sox 催化机制的研究从未中断。2002 年 Bamford 等^[7]在 *Rs* SoxAX 蛋白结晶结构的研究基础上, 参照硫氰酸酶的催化机理, 首次提出了 SoxAX 与硫代硫酸盐的催化机制假说。该假说认为, SoxAX 在 Sox 系统中扮演着硫转移酶的角色, SoxAX 上血红素 HEC2 与 HEC3 附近活性口袋是主要反应区。HEC2 结合区域附近的 Arg A210 因带有很强正电荷势能, 吸引带负电的含硫阴离子进入活性口袋区, 与 Cys A222 上的巯基形成异质二硫键, SoxAX 上血红素 HEC2 与 HEC3 上的铁离子主

要承担电子传递作用，反应脱去的两个电子传递给细胞色素 c，可能被用于氧化呼吸链或是硫代谢偶联的反硝化反应。随后 Bradley^[12]和 Grabarczyk^[11]等的研究结果也印证了这一点。但由于 SoxAX 与底物或产物结合的结晶结构尚未获得解析，也尚缺乏 SoxAX 与 SoxYZ 或细胞色素 c 结合的结晶结构，电子传递路径也尚不明了，因此尚缺乏支撑此 SoxAX 催化机制的直接证据，而脱氮硫杆菌的硫代谢机制的研究也有赖于后续结晶结构的研究数据支持。

2.1 脱氮硫杆菌 SoxAX 蛋白二聚体的构建

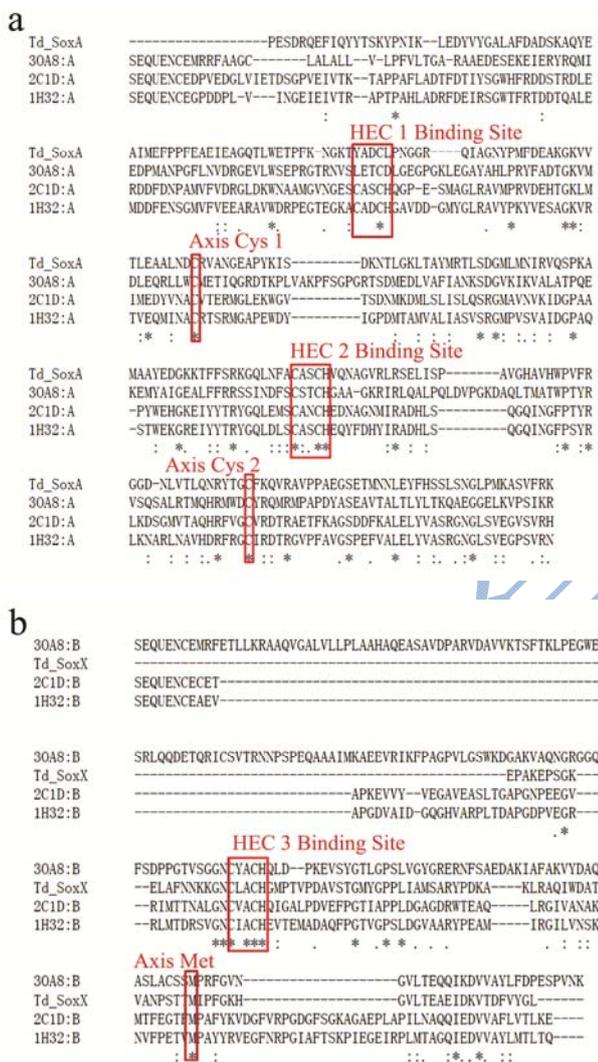


图1 脱氮硫杆菌 SoxAX 二聚体初始结构与 1H32_AB、2C1D_AB、3OAB_AB 多序列比对和结构比对

Fig.1 Multiple sequence alignment and structure alignment of SoxAX with 1H32_AB, 2C1D_AB, and 3OAB_AB

注：a，SoxA 与 3 个模板的序列比对结果，b，SoxA 与 3 个模板的序列比对结果，高保守区以“*”表示，中保守区以“:”表示，低保守区以“.”表示，血红素结合位点相关氨基酸残基以红色虚线框标出。

选择去除信号肽的 SoxA (29-281) 序列和 SoxX (26-120) 序列用于建模。Blast 和 PSI-Blast 结果表明，PDB 数据库中与 SoxAX 匹配的结果有三个结晶结构 (PDB ID: 2C1D, 1H32, 3OAB) 与其相配，序列相似度分别为 SoxA: 2C1D_E (28%)、1H32_A (27%) 和 3OAB (24%); SoxX: 1H31_B (34%)、3OAB_B (35%) 和 2C1D_B (24%)。目标蛋白与模板的序列比对结果见图 1a 和图 1b。经 i-Tasser 服务器构建了 5 个 SoxA 蛋白的初始蛋白，其中评分最高的 model1 (记做 SoxA1) 的 C-score=0.74，Estimated TM-score=0.81±0.09, Estimated RMSD=4.30±2.90Å; 此外 i-tasser 服务器共构建了 1 个 SoxX 蛋白的初始蛋白 (记做 SoxX1)，该模型 C-score=0.74，Estimated TM-score=0.81±0.09, Estimated RMSD=4.3±2.9Å。选用这两个模型拟合到 1H32 上构建 SoxAX 二聚体。

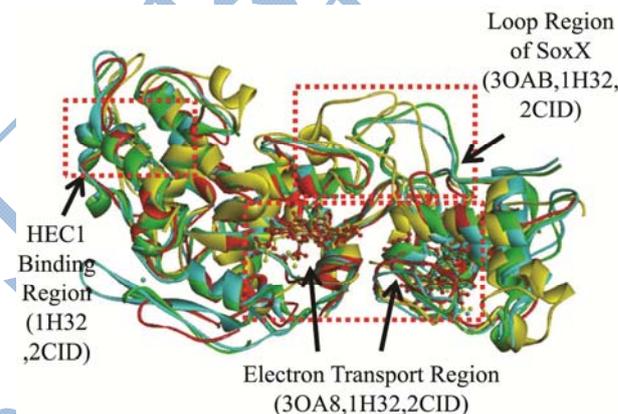


图2 脱氮硫杆菌 SoxAX 二聚体与 3 个模板的单二聚体的结构比对结果

Fig.2 Structure alignment between SoxAX and the three templates

注：脱氮硫杆菌 SoxAX 以红色显示；1H32_AB 以绿色表示；2C1D_AB 以蓝色表示；3OAB_AB 以黄色表示。

根据 1H32 构建的脱氮硫杆菌 SoxAX 二聚体初始结构与 1H32、2C1D、3OAB 单二聚体结构比对结果如图 2 所示。血红素结合区域 (CXXCH) 在 SoxAX 家族高度保守，而脱氮硫杆菌 SoxAX 为 3 类 SoxAX 蛋白^[6]，与属于 2 类的 3OAB 相似^[6,9]，仅有 HEC2 和 HEC3 两个血红素配体，蛋白上的 Cys 的巯基与血红素 Ca 骨架共价连接。而因此可以初步判定脱氮硫杆菌 SoxAX 中与血红素结合的区域为 SoxA 亚基上的 CYS168:SG-HEC2:CAB 和 CYS171:SG-HEC2:CAC 以及 SoxX 亚基上的 HEC3:CAB-CYS20:SG 和 HEC1139:CAC-CYS23:SG。将血红素经初步处理后，插入 SoxAX 配体所在相应的位置，得到 SoxAX 含血红素的二聚体初始结构，血红素命名规则沿用 1H32 的命名

规则。

2.2 SoxAX 二聚体优化与评估

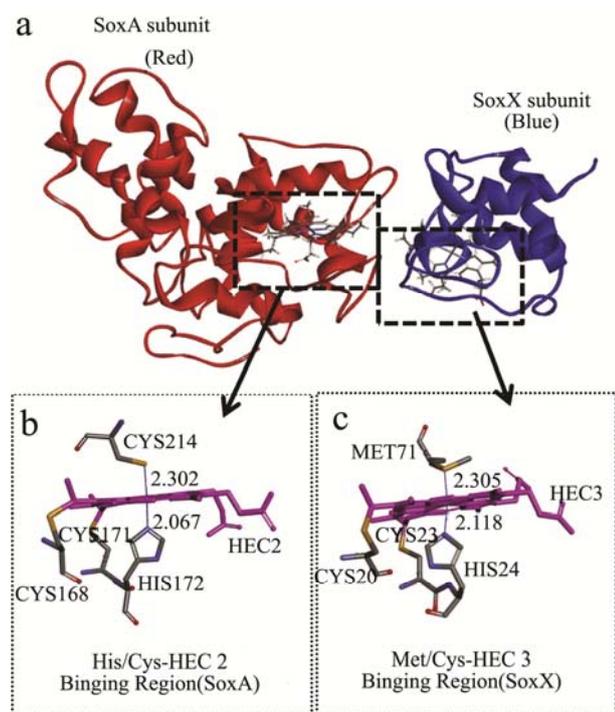


图3 脱氮硫杆菌 SoxAX 二聚体结构及评估结果

Fig.3 Results for 1ns molecular dynamics simulation of the SoxAX dimer

注：a，优化后的 SoxAX 二聚体结构；b，SoxA His/Cys-细胞色素 c 配位键区细节图；c，SoxX His/Met-细胞色素 c 配位键区细节图。粉色为血红素平面，深蓝色表示血红素中心铁离子与 His，Cys 或 Met 形成的配位键和键长。

利用 Discovery Studio 分子模拟平台，SoxAX 二聚体经四步能量最小化优化后最终获得稳定结构（如图 3a~c 所示），最终势能为-23696.03499 kcal/mol。PROCHECK 程序评估后产生的 Ramachandran 图（如图 4a 所示），氨基酸残基允许区域的分布为 93.97%，一般而言允许区域大于总体的 90%，我们可以认为该模型的构象符合立体化学的规则。而且，该二聚体中不合理氨基酸均分布在远离 SoxAX 活性区域的 Loop 区，对活性中心的影响较小，故该不合理角度是可以接受的。Verify Protein (Profiles-3D) 评估打分结果如图 4b 所示，评估结果显示 SoxAX 二聚体的自兼容打分 Verify Score 值为 104.36，远高于 Verify Expected Low Score 值 71.34，接近 Verify Expected High Score 值 158.54，说明蛋白质模型三维结构与自身氨基酸序列的兼容性是合理的。ProSA 服务器在线评估结果(图 4cd)显示，SoxA 的 Z-score 值为-5.39，SoxX 的 Z-score 值-4.79，在图中用黑色圆点表示，均处于根据 PDB

数据库所有蛋白质结晶结构所绘得的 Z-score 分布区域中，这说明所我们构建的 SoxAX 蛋白模型在能量上是合理的。综合上述三项评测结果表明，构建的 SoxAX 建模结果是可靠的。

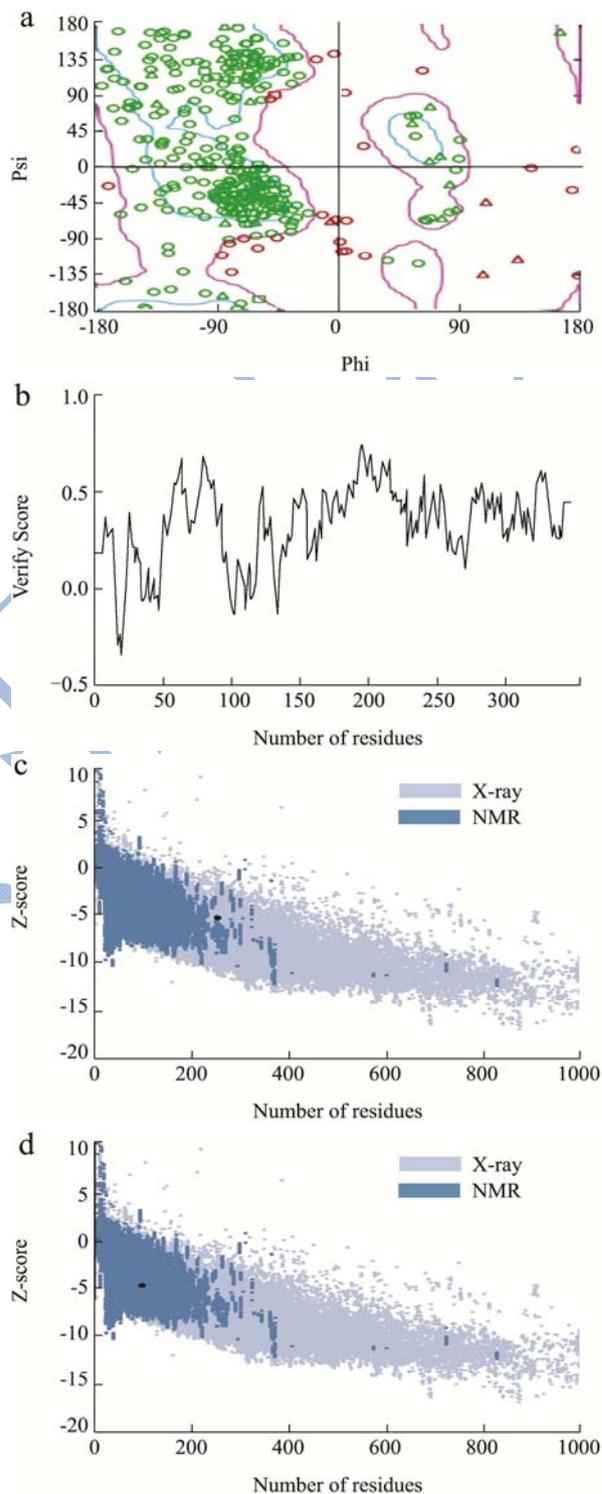


图4 脱氮硫杆菌 SoxAX 二聚体结构评估结果

Fig.4 Evaluation results of the optimized SoxAX dimer

注：a，SoxAX 最终模型的拉氏图；b，SoxAX 最终模型的 profile-3D 评价；c，最终模型的 SoxA 亚基 ProSA 评价；d，最终模型的 SoxX 亚基 ProSA 评价。

脱氮硫杆菌 ATCC 25259 的 SoxAX 蛋白由 SoxA 和 SoxX 两个亚基构成, 去除信号肽后成熟的 SoxA 和 SoxX 亚基所含氨基酸残基数分别为 253 和 95, 它们都拥有典型的细胞色素 c 结构域折叠类型。SoxA 具有典型的 SoxA 家族结构特征, 含两个类细胞色素 c 结构域, 仅在 C 端结构域上结合一个血红素, 结合位点为 Cys168 和 Cys171, HEC 2、His172 与 Cys214 形成 His/Cys-heme 相互作用中心, 该位点为电子传递及硫化物底物结合位点(如图 3b)。SoxX 均为典型的细胞色素 c 结构域, 包含三个螺旋区并仅含有一个与 Cys20 和 Cys23 的侧链共价相连的血红素, HEC3、His24 与 Met71 形成 His/Met-heme 相互作用中心(如图 3c), 该作用中心主要起电子传递作用。

2.3 SoxAX 二聚体相互作用分析

2.3.1 氢键、 π 键及盐键相互作用分析

界面分析发现 SoxA 亚基在 SoxAX 二聚体相互作用面上涉及的氨基酸包括 Arg160、Gly162、Gln163、Leu164、Asn165、Phe166、Ser170、Cys171、Gln174、Asn175、Val178、Arg179、Leu180、Arg181、Ser182、Ile185 和 Arg219 等 18 个残基和血红素 HEC2; SoxX 亚基在相互作用面上涉及的氨基酸包括 Ala12、Phe13、Asn15、Lys16、Lys17、Gly18、Asn19、Ala22、Cys23、Val33、Ser34、Thr35、Gly36、Met37、Tyr38、Thr63、Ser68、Thr69、Thr70、Met71、Ile72、Pro73、His77、Gly78 和 Val79 等 25 个残基及血红素 HEC3。其中 SoxAX 二聚体界面处共含有 10 个氢键来维持其三维结构的稳定, 两亚基界面未检测到盐键作用力。界面处各氨基酸残基间的氢键相互作用如图 5 所示, 表 1 列出了 SoxAX 二聚体在结合界面处参与氢键形

成的氨基酸残基及其氢键键长, 它们主要是由一侧亚基上氨基酸残基的羰基氧与另一侧亚基氨基酸残基的酰胺氢相互作用所形成, 氢键键长均小于 2.70 Å, 属于短强氢键, 此类氢键对维持蛋白质三维结构的稳定性有重要意义。除氢键外, SoxA:Arg181 上侧链的 N 与 SoxX:Phe13 侧链上的苯环间形成 π 键作用力。因此, 氢键和 π 键作用力是稳定 SoxAX 二聚体构象的主要作用力, 而其中氢键起主导作用, 其中涉及的主要氨基酸残基为 SoxA 的 Arg160、Asn165、Val178、Arg179、Arg181、Arg219 及 SoxX 的 Asn15、Lys16、Asn19、Thr35、Met37、Thr38、Thr69、His77。

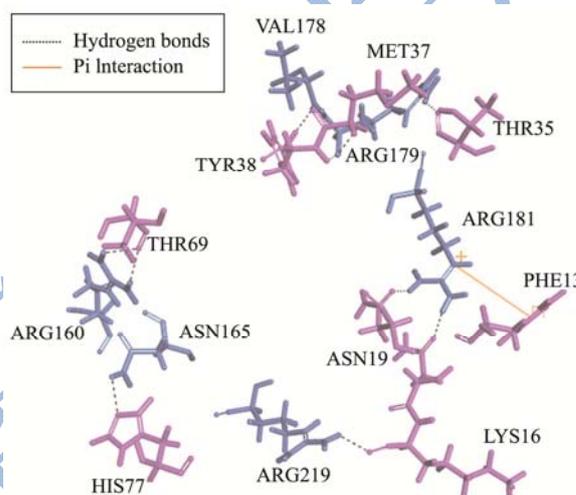


图 5 SoxAX 二聚体的结合界面处氨基酸作用力分布

Fig.5 Distribution of amino acid interactions at the binding interface of the SoxAX dimer

注: SoxA 界面处残基蓝色残基用蓝色表示; SoxX 界面处残基用粉色表示; 氢键用黑色的虚线表示; π - π 作用力用橙色实线表示。

表 1 SoxAX 二聚体结合界面处残基间氢键统计

Table 1 Statistical summary of hydrogen bonds among the residues at the interface of SoxAX dimers

Receptor Residue	Ligand esidue	Interaction Constituents	Distanc/Å
A:ARG160	B:THR69	A:ARG160:HH12 - B:THR69:O	2.0925
A:ARG160	B:THR69	A:ARG160:HH22 - B:THR69:O	2.164
A:ASN165	B:HIS77	A:ASN165:HD21 - B:HIS77:NE2	2.3877
A:ARG179	B:THR35	A:ARG179:HH11 - B:THR35:O	1.7571
A:ARG181	B:ASN15	A:ARG181:HH12 - B:ASN15:OD1	1.9288
A:ARG181	B:ASN19	A:ARG181:HH22 - B:ASN19:OD1	2.4075
A:ARG219	B:LYS16	A:ARG219:HH11 - B:LYS16:O	2.2401
A:ARG179	B:MET37	B:MET37:HN - A:ARG179:O	2.2194
A:ARG179	B:TYR38	B:TYR38:HN - A:ARG179:O	2.19
A:VAL178	B:TYR38	B:TYR38:HH - A:VAL178:O	1.8132

注: A chain 指 SoxA 亚基; B chain 指 SoxX 亚基。

表2 SoxAX 二聚体结合界面处残基间 $\pi-\pi$ 相互作用力统计

Table 1 Statistical summary of pi interactions among residues at the interface of SoxAX dimers

Receptor Residue	Ligand esidue	Interaction Constituents	Distanc/Å
A:ARG181	B:PHE13	B:PHE13-A:ARG181:NE	6.19

2.3.2 静电相互作用分析

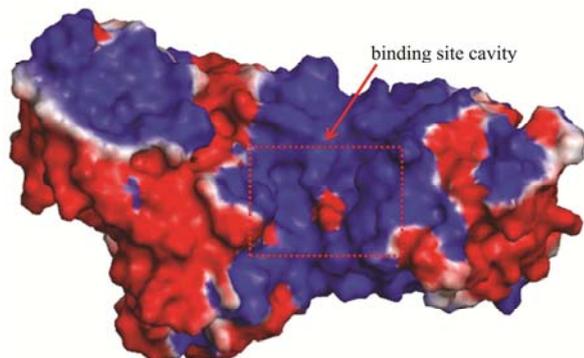


图6 SoxAX 二聚体各氨基酸残基的静电势能分布图

Fig.6 Electrostatic potential distribution of the SoxAX dimer

注: 蓝色为正电势区; 红色为负电势区。

SoxAX 二聚体表面中心区域存在大面积的正电势区域(见图6), 而两端主要以负电势区域为主, 血红素 HEC2 结合部位附近的腔体主体以正电势区为主, 腔体边缘存在一个负电势区(Glu183 附近), 腔体正电势区的存在有助于含硫阴离子与 SoxA Cys214 残基上的 S_{γ} 硫原子共价结合^[6]。SoxAX 二聚体中各个氨基酸残基的平均电势的区间范围为 -57.96 kT/e-71.88kT/e。体系总电势能为 2212.70 kT/e。

2.4 SoxAX 与底物分子对接

2.4.1 SoxAX 活性中心定位

DS 程序根据孔洞自动检索并产生了 13 个可能的活性中心球, 其中 Site 12 为对接硫代硫酸盐 $S_2O_3^{2-}$ 的最佳位点。活性球的坐标为 (21.334, 66.871, 23.212) 半径为 7Å。此位点主要由 4 个残基(Arg210, Gly213, Cys214, Gln217) 和血红素 HEC2 组成。

2.4.2 SoxAX 与硫代硫酸盐 $S_2O_3^{2-}$ 分子对接

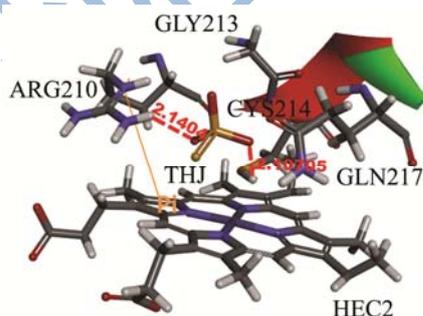


图7 SoxAX 与底物 $S_2O_3^{2-}$ 的对接结果

Fig.7 Docking results of SoxAX and thiosulfate

注: 氢键用红色虚线表示; $\pi-\pi$ 作用橙色表示。

脱氮硫杆菌 SoxAX 与 $S_2O_3^{2-}$ 的柔性对接共得到 30 个可能的构象, 其结合能 (binding energy) 均小于 0。选脱氮硫杆菌 SoxAXd 蛋白 (Td SoxAX) 综合配体构象和 CDOCKER Energy 最佳的对接结果 pos 23 进行分析(记做 Td SoxAX: $S_2O_3^{2-}$), 对接结果显示 SoxAX 与底物 $S_2O_3^{2-}$ 共形成 2 个氢键(图7)。参与与底物相互作用的残基为 Arg210、Cys214 和血红素, 氢键在 SoxA 上的 A:Arg210:HH11 与硫代硫酸盐 THJ:O5, 以及 SoxA 上的 A:Cys214:HG 与硫代硫酸盐 THJ:O4 原子间产生, 键长分别为 2.4104 Å 和 2.1071 Å, 可见氢键是维持底物与 SoxAX 结合的主要作用能, 而主要与底物 $S_2O_3^{2-}$ 的产生相互作用参加是 Arg210 和 Cys214, 与文献报道预测的催化机制相一致^[6-9,11,12]。另外 His210 残基末段的咪唑基与血红素的卟啉环相互作用, 共产生 1 个 $\pi-\pi$ 相互作用, 主要起稳定血红素结构的作用。结合能计算结果表明, 脱氮硫杆菌 SoxAX 与底物硫代硫酸盐对接的最佳 pose 结合能为 -7.69 kcal/mol。

2.4.3 SoxAX 与硫代硫酸盐 H_2S 分子对接

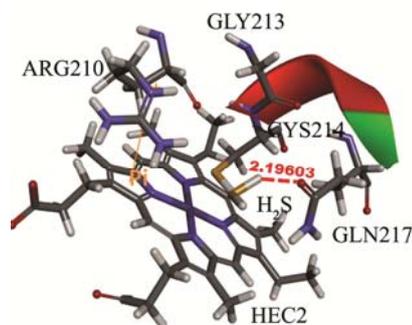


图8 SoxAX 与底物 H_2S 对接结果

Fig.8 Docking results of SoxAX and hydrogen sulfide

注: 氢键用红色虚线表示; $\pi-\pi$ 作用橙色表示。

脱氮硫杆菌 SoxAX 与 H_2S 的柔性对接共得到 30 个可能的构象, 其结合能 (binding energy) 均小于 0。选脱氮硫杆菌 SoxAXd 蛋白 (Td SoxAX) 综合配体构象和 CDOCKER Energy 最佳的对接结果 pos 24 进行分析(记做 Td SoxAX: H_2S), 对接结果显示 SoxAX 与底物 H_2S 共形成 1 个氢键(图8)。参与与底物相互作用的残基为 Gln217 和血红素, 在 SoxA 上的 A:Gln217:OE1 与亚硫酸盐 $H_2S:H_3$ 形成键长为 2.19603 Å 的短强氢键。另外 His210 残基末段的咪唑基与血红素的卟啉环相互作用, 共产生 1 个 $\pi-\pi$ 相互作用, 主要起稳定血红素结构的作用。结合能计算结果表明,

脱氮硫杆菌 SoxAX 与底物硫代硫酸盐对接最佳 pose 的结合能为-12.88 kcal/mol。

2.4.4 SoxAX 与亚硫酸盐 SO₃²⁻分子对接

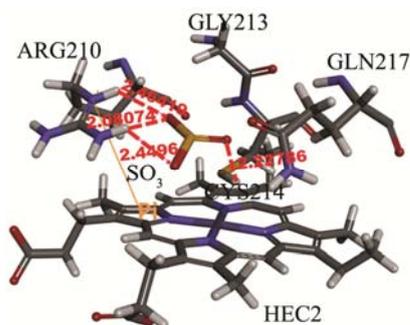


图9 SoxAX 与底物 SO₃²⁻ 的对接结果

Fig.9 Docking results of SoxAX and sulfite

注：氢键用红色虚线表示； π - π 作用橙色表示。

脱氮硫杆菌 SoxAX 与 S₂O₃²⁻ 的柔性对接共得到 30 个可能的构象，其结合能 (binding energy) 均小于 0。选脱氮硫杆菌 SoxAX 蛋白 (*Td* SoxAX) 综合配体构象和 CDOCKER Energy 最佳的对接结果 pos 30 进行分析 (记做 *Td* SoxAX: SO₃²⁻)，对接结果显示 SoxAX 与底物 SO₃²⁻ 共形成 4 个氢键 (图 9)。参与与底物相互作用的残基为 Arg210、Cys214 和血红素，4 个氢键分别在 SoxA 上的 A:Arg210:HE 与亚硫酸盐 SO₃:O₄，

A:Arg210:HH11 与亚硫酸盐 SO₃:O₃，SoxA 上的 A:Arg210:HH11 与亚硫酸盐 SO₃:O₃ 以及 A:Cys214:HG 与亚硫酸盐:O₂ 原子间产生，可见氢键是维持底物与 SoxAX 结合的主要作用能，而与底物 SO₃²⁻ 的产生相互作用残基为 Arg210 和 Cys214。另外 His210 残基末段的咪唑基与血红素的卟啉环相互作用，共产生 1 个 π - π 相互作用，主要起稳定血红素结构的作用。结合能计算结果表明，脱氮硫杆菌 SoxAX 与底物硫代硫酸盐对接最佳 pose 的结合能为-5.58 kcal/mol。

2.4.5 SoxAX 与不同底物对接的对比结果

脱氮硫杆菌 SoxAX 与不同底物结合最优结构的结合能和氢键统计结果见表 3 和表 4，在三种底物的结合能排序分别为 H₂S>S₂O₃²⁻>SO₃²⁻。但在氢键的成键数量上看，氢键类型以蛋白质上的极性氢与配体羰基上的氧形成的 H:O 键为主，而在 H₂S 对接中则是以底物上的 H₃ 为电子供体，Gln21 侧链羧基上的 OE1 为受体形成氢键。其中 SO₃²⁻ 形成的氢键数量最多但却是三种底物对接中结合能最高的，这可能是由于 SoxA:ARG210:HH11 与亚硫酸盐 SO₃:O₃ 之间形成的氢键容易在底物在底物在活性口袋中自由移动过程中断裂，形成对接试验中 pos20 的构象，因而造成结合能增高。

表 3 SoxAX 二聚体与不同底物对接最佳构象结合能统计

Table 3 Statistical summary of binding energy of the best pose between complex SoxAX dimer and different substrates

Ligand Name	Pose No.	Binding Energy / (kcal/mol)	Ligand Energy / (kcal/mol)	Protein Energy/(kcal/mol)	Complex Energy/(kcal/mol)	Entropic Energy/(kcal/mol)
THJ	23	-7.69	3.10	-23564	-23568.13	16.04
H ₂ S	24	-11.41	0.00	-23564	-23574.95	11.31
SO ₃	30	-5.58	0.00	-23564	-23569.12	15.03

表 4 SoxAX 二聚体与不同底物对接的氢键统计

Table 4 Statistical summary of binding energy of the best pose between complex SoxAX dimer and different substrates

#Ligand Name	Hydrogen bonds Name	Distance	Donor Atom	Acceptor Atom	Angle DHA	Angle HAY
THJ	A:ARG210:HH11 - THJ:O ₅	2.41	HH11	O ₅	123.76	84.11
THJ	A:CYS214:HG - THJ:O ₄	2.11	HG	O ₄	112.67	112.03
H ₂ S	H ₂ S:H ₃ -A:GLN217:OE1	2.20	H3	OE1	123.45	93.32
SO ₃	A:ARG210:HE - SO ₃ :O ₄	2.46	HE	O ₄	130.64	152.75
SO ₃	A:ARG210:HH11 - SO ₃ :O ₃	2.45	HH11	O ₃	123.86	77.60
SO ₃	A:ARG210:HH11 - SO ₃ :O ₄	2.08	HH11	O ₄	142.65	91.50
SO ₃	A:CYS214:HG - SO ₃ :O ₂	2.23	HG	O ₂	107.09	111.02

3 结论

本文以反向折叠法构建了 SoxAX 成熟蛋白的二聚体结构。采用 PROCHECK、Verify_3D 和 ProSA 在线服务器从结构和能量两方面验证了模型的合理性。氢键是维持 SoxAX 二聚体结合的主要作用力，界面

处有 10 个短强氢键和一个 π - π 作用力参与维持二聚体结构的稳定，SoxA 的 Arg160、Asn165、Arg178、Val179、Arg181、Arg219 及 SoxX 的 Asn15、Lys16、Asn19、Thr35、Met37、Thr38、Thr69、His77 等残基对维持二聚体结构有重要作用。分子对接试验显示氢键是维持底物与 SoxAX 结合的主要作用力，与底物

结合的关键氨基酸为 Arg210、Cys214 和 Gln217, 在三种底物与酶结合的亲和力中以硫化氢最高、硫代硫酸盐次之、亚硫酸盐最低。

参考文献

- [1] Beller H R, Chain P S, Letain T E, et al. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1473-1488
- [2] Shao M F, Zhang T, Fang H P. Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 88(5): 1027-1042
- [3] Friedrich C G, Bardischewsky F, Rother D, et al. Prokaryotic sulfur oxidation [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 253-259
- [4] Falkenby L G, Szymanska M, Holkenbrink C, et al. Quantitative proteomics of *Chlorobaculum tepidum*: insights into the sulfur metabolism of a phototrophic green sulfur bacterium [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2011, 323(2): 142-150
- [5] Holkenbrink C, Barbas S O, Mellerup A, et al. Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system [J]. *Microbiology*, 2011, 157(2): 1229-1239
- [6] Kappler U, Maher M J. The bacterial SoxAX cytochromes [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2012, 70(6): 977-992
- [7] Bamford V A, Bruno S, Rasmussen T, et al. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme [J]. *Embo Journal*, 2002, 21(21): 5599-5610
- [8] Dambe T, Quentmeier A, Rother D, et al. Structure of the cytochrome complex SoxXA of *Paracoccus pantotrophus*, a heme enzyme initiating chemotrophic sulfur oxidation [J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 152(3): 229-234
- [9] Kilmartin J R, Maher M J, Krusong K, et al. Insights into structure and function of the active site of SoxAX cytochromes [J]. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(28): 24872-24881
- [10] Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(1): 174-181
- [11] Grabarczyk D B, Chappell P E, Eisel B, et al. Mechanism of thiosulfate oxidation in the SoxA family of cysteine-ligated cytochromes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(14): 9209-9221
- [12] Bradley J M, Marritt S J, Kihlken M A, et al. Redox and chemical activities of the hemes in the sulfur oxidation pathway enzyme SoxAX [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(48): 40350-40359
- [13] Touw W G, Joosten R P, Vriend G. New biological insights from better structure models [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(6): 1375-1393
- [14] Kryshtafovych A, Monastyrskyy B, Fidelis K. CASP11 statistics and the prediction center evaluation system [J]. *Proteins Structure Function & Bioinformatics*, 2016, 9(12): 2957-2977